

細胞質型チロシンホスファターゼ PTP-PEST によるマスト細胞

活性化シグナルの制御機構

11RD001Y

本橋 智

目次

1. 要旨	3
2. 序論	6
2.1. I型アレルギーの概要	6
2.2. マスト細胞活性化シグナル	7
2.3. タンパク質チロシンキナーゼとタンパク質チロシンホスファターゼ	7
2.4. PTP-PEST	8
3. 方法と材料	11
3.1. 抗体	11
3.2. 細胞及び刺激方法	11
3.3. プラスミドの作成及びトランスフェクション	12
3.4. 脱顆粒の計測	13
3.5. イムノブロッティング法	14
3.6. 脱リン酸化活性測定	14
3.7. リアルタイム RT-PCR	15
3.8. 統計解析	16
4. 結果	17
4.1. FCεRI 架橋による PTP-PEST の発現	17
4.2. PTP-PEST Ser39 の FCεRI 架橋によるリン酸化	17
4.3. FCεRI 架橋による RBL-2H3 細胞の脱顆粒活性における PTP-PEST の制御	20
4.4. FCεRI 架橋による RBL-2H3 細胞のサイトカイン転写活性における PTP-PEST の制御	21
4.5. FCεRI 架橋による RBL-2H3 細胞内シグナル伝達における PTP-PEST の制御する分子の検討	23
5. 考察	26
5.1. マスト細胞の抗原刺激による細胞内シグナル伝達への PTP-PEST の関与	26
5.2. マスト細胞の抗原刺激によるシグナル伝達において PTP-PEST が制御する分子の検討	29
5.3. 結論	31
6. 参考文献	32

1. 要旨

PTP-PEST は分子量 120 kDa の細胞質型タンパク質チロシン脱リン酸化酵素 (Protein tyrosine phosphatase: PTP) である。PTP-PEST は N 末端側に高度に保存された酵素領域、C 末端側に 5 つの Pro-rich domain、4 つの PEST motif を含む比較的長い非酵素領域を持つ酵素で、その非酵素領域には様々なシグナル分子が結合することが知られている。

本研究では生体のアレルギー反応において、中心的な役割を担う細胞の1つであるマスト細胞の抗原刺激(FcεRI 架橋)による活性化シグナルの伝達機構に PTP-PEST が関与しているかどうかを、ラットのマスト細胞株である RBL-2H3 細胞で検討した。PTP-PEST の mRNA 量は FcεRI の架橋によって誘導され、架橋後 6 時間まで直線的に増加し、6 時間後には FcεRI 架橋前に比べ約 4 倍になることが分かった。また、PTP-PEST の酵素活性が負に制御される 39 番目のセリン残基 (Ser39) が、FcεRI 架橋後 5 分をピークにリン酸化されることが分かった。さらに、Ser39 の脱リン酸化には PTP-PEST の C 末端側の非酵素領域が必要であることも分かった。これらの結果から、FcεRI が架橋された RBL-2H3 細胞では、PTP-PEST の mRNA 量を増加させる一方で、Ser39 のリン酸化により酵素活性が制御されていることが分かった。

RBL-2H3 細胞において、PTP-PEST の発現量や酵素活性が FcεRI の架橋により制御されることから、酵素活性に必須の 231 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した常不活性変異酵素 PTP-PEST CS と 39 番目のセリン残基をアラニン残基に置換し、リン酸化を受けない常活性変異酵素 PTP-PEST SA を RBL-2H3 細胞に過剰発現させて、FcεRI 架橋により刺激に対する応答を調べた。その結果、脱顆粒は PTP-PEST CS

と PTP-PEST SA を、それぞれ過剰発現させた細胞において有意に抑制されていた。この結果は、FcεRI 架橋による脱顆粒を PTP-PEST が抑制的に制御していることを示したが、この PTP-PEST による脱顆粒の抑制には PTP 活性を必要としないことが示された。次に、FcεRI 架橋により転写が誘導されることが知られている 3 種のサイトカインの中で、TNF-α の転写は PTP-PEST の酵素活性に依存して正に制御されていたが、IL-4 と IL-13 の転写は PTP-PEST の酵素活性に依存しないで正に制御されていた。以上の結果から、PTP-PEST は RBL-2H3 細胞において FcεRI 架橋による活性化シグナルを酵素活性非依存的と酵素活性依存的の 2 つの機構により制御していることが示された。

次に、マスト細胞の FcεRI 架橋による活性化シグナルの中で、PTP-PEST によって制御されるシグナル分子について検討したところ、サイトカインの転写誘導の重要なシグナル分子である 3 種の Mitogen-activated Protein kinase (MAP キナーゼ) と Akt の活性化には PTP-PEST は関わっていなかった。しかし、PTP-PEST は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や Protein Kinase C (PKC) の活性化を誘導する Phospholipase Cγ1 (PLCγ1) の活性化を酵素活性非依存的に抑制していた。また、T 細胞や B 細胞などの免疫担当細胞において、PTP-PEST の基質であると報告されている Focal Adhesion Kinase (FAK) と Proline-rich Tyrosine kinase 2 (Pyk2) について検討したところ、PTP-PEST は酵素非依存的に FAK のチロシン残基のリン酸化による活性化を抑制したが、Pyk2 のチロシン残基のリン酸化による活性化には関与しなかった。これらの結果は、RBL-2H3 細胞における PTP-PEST の酵素活性非依存的制御には PLCγ1 と FAK が関わっている可能性を示している。PLCγ1 や FAK の活性化は脱顆粒の誘導のシグナルの 1 つであることが知

られているので、PTP-PEST による脱顆粒の酵素活性非依存的な抑制に、PLC γ 1 と FAK の活性化の抑制が関わっている可能性を強く示唆している。しかし、PTP-PEST によるサイトカインの転写活性の酵素活性依存的と非依存的な制御に関わる分子を明らかにすることができなかったため、これらの分子の同定は今後の課題である。

2. 序論

2.1. I 型アレルギーの概要

アレルギー (Allergy) は特定の多価抗原 (Allergen) に対し、生体防御反応が過剰に働くことを指し、過敏症 (Hypersensitivity) とも呼ばれている。アレルギーは発生機構によりI型からV型に分類されることが多い。一般的に多価抗原であるスギ花粉やハウスダスト等により惹き起こされるアレルギーは免疫グロブリン E (IgE)が関与する I 型に分類される。

I 型アレルギーでは、B 細胞が抗体産生細胞である形質細胞に分化する際に、2型ヘルパーT 細胞 (Th2) が産生するインターロイキン-4 (IL-4) などのサイトカインが存在すると、免疫グロブリン遺伝子は免疫グロブリン M (IgM) から IgE にクラススイッチする。形質細胞から産生された IgE は、マスト細胞や好塩基球などの細胞表面に存在する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合する。そこに IgE と反応性を持つ多価抗原が IgE と結合すると FcεRI の凝集が起こり、マスト細胞は活性化する。その結果、マスト細胞は細胞内の顆粒に貯蔵されている種々の生理活性化合物を細胞外に放出する(脱顆粒)。放出される生理活性化合物の中で、ヒスタミンは血管透過性を亢進させることにより急性の炎症を促進する。また、ロイコトリエンやサイトカイン、ケモカインなどの分子は炎症における遅延型反応に関与し、炎症性細胞を動員するシグナルとなる(1)。以上のようにI型アレルギーの中で、FcεRIを細胞表面に持つマスト細胞は重要な働きを担っており、マスト細胞の FcεRI 架橋による活性化の制御機構を明らかにすることは、I 型アレルギーを理解する上で重要である。

2.2. マスト細胞活性化シグナル

現在において、一般的に受け入れられているマスト細胞活性化のシグナル伝達の概要は次のようになっている。マスト細胞や好塩基球に発現している FcεRI は、αサブユニット、βサブユニット、2 個のγサブユニットから構成されている。αサブユニットの細胞外領域は IgE と結合する領域であり、β及びγサブユニットの細胞質側領域には immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれるチロシン残基が高度にリン酸化される領域が存在する。FcεRI のαサブユニットに IgE/多価抗原が結合し、FcεRI の凝集が起こると、FcεRI のβとγサブユニットの ITAM のチロシン残基が、活性化を受けた Src 型チロシンキナーゼの Lyn や Fyn によってリン酸化される(2,3)。すると、SH2 ドメインを2個持つチロシンキナーゼの Syk が、チロシン残基がリン酸化された ITAM の部位にリクルートされ、そこで Syk もリン酸化されて活性化する。活性化した Lyn や Fyn と Syk は LAT (linker for activated T cells)や NTAL (non-T-cell activation linker)などの様々な分子のチロシン残基をリン酸化する。その結果、チロシン残基がリン酸化された分子が様々なシグナル分子の足場として働き、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 経路、Phospholipase C-γ (PLC-γ)/Ca²⁺/Protein kinase C (PKC) 経路、Grb2/Sos/Ras/MAP キナーゼ経路などの様々なシグナル経路が活性化され、その結果として脱顆粒やサイトカインの転写が亢進することが知られている(2)(図1)。

2.3. タンパク質チロシンキナーゼとタンパク質チロシンホスファターゼ

マスト細胞の活性化シグナルの伝達は、上述のように細胞内のタンパク質のチロシン残基のリン酸化が重要な働きをしている。種々のタンパク質のチロシン残基のリン酸

化は、リン酸化チロシン残基と特異的に結合するドメインである SH2 (Src homology 2) ドメインや PTB (phosphotyrosine-binding)ドメインを持つ分子が集合し、その場で様々なシグナル経路を活性化する。タンパク質のチロシン残基のリン酸化はタンパク質チロシンキナーゼ(protein tyrosine kinase: PTK)と同時に、タンパク質チロシンホスファターゼ(protein tyrosine phosphatase: PTP)によって制御されている(図2)。このことからマスト細胞の活性化シグナルの制御を考える上で、PTKと同様に PTP の研究も重要となる。しかし、現在、マスト細胞の活性化シグナルの制御に関わる PTP に関する報告は少なく、不明な点が多く残っている。

2.4. PTP-PEST

現在、ヒトゲノム解析の結果から、ヒトでは 107 個の PTP 遺伝子が存在することが知られているが、免疫担当細胞では少なくともその半分の PTP が発現している(4)。マスト細胞の活性化シグナルを制御する PTK に関する研究はたくさんあるが、マスト細胞活性化シグナルを制御する PTP に関する研究はわずかしかない。PTP-PEST (PTPN12) は分子量約 120 kDa の細胞質型 PTP で免疫担当細胞を含むあらゆる細胞で発現している。PTP-PEST のノックアウトマウスは胎生致死に至ることが報告されており、生体の生存に必須の分子である(4)。PTP-PEST の構造は N 末端側に約 300 アミノ酸残基からなる酵素領域、C 末端側に比較的長い非酵素領域からなる。C 末端側の非酵素領域にはタンパク質間相互作用に関わるプロリン残基に富む領域 (Pro-rich domain) を 5 個、分子の寿命に関係すると考えられているプロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニンに富む領域 (PEST motif) が 4 個存在する。PEST motifはそのタンパク質の細胞内

における半減期の制御に関与していると考えられている(5)。この C 末端側の非酵素領域は Cas、Shc、paxillin、Csk などの様々なシグナル分子を結合させるシグナル伝達の”足場”としての役割も担っていると考えられている(6)。また、PTP-PEST は 39 番目のセリン残基 (Ser39) のリン酸化/脱リン酸化により酵素活性が制御されていること(7)、また 231 番目のシステイン残基(Cys231)が PTP 活性には必須であること(8)がこれまでに明らかにされている(図3)。

PTP-PEST の機能の研究は主に接着細胞において行われ、PTP-PEST は細胞外マトリックス分子の受容体であるインテグリンからのシグナルを制御し、細胞接着や細胞移動を制御することが知られている(9-12)。しかし、最近の研究から PTP-PEST は破骨細胞や免疫担当細胞においても重要な役割を担っていることが示されている。破骨細胞においては PTP-PEST の酵素活性を阻害することで WASP 及びそれに関連した分子のリン酸化が亢進されることが明らかになった。これは PTP-PEST が Sealing-ring の形成と骨吸収に関与していることを示唆している(13)。また、B 細胞株の A20 細胞を用いた研究から、PTP-PEST は Shc、Pyk2、FAK 及び p130Cas のリン酸化を抑制し、抗原シグナルを負に制御していることが明らかにされている(6)。T 細胞では WASP 及び Pyk2 を脱リン酸化することで WASP によるアクチン重合、シナプス形成及び T cell antigen receptor (TCR)からのシグナル伝達を抑制することが明らかにされている(14-16)。

以上のようにマスト細胞の活性化シグナルの制御機構が比較的類似していると考えられている T 細胞や B 細胞で、PTP-PEST が抗原受容体からの活性化シグナルを制御していると報告から、マスト細胞においても PTP-PEST が活性化シグナルを制御

している可能性が高いと考え、本研究では、マスト細胞の活性化シグナルが PTP-PEST によって制御されるかどうかを中心に検討を行った。

3. 方法と材料

3.1. 抗体

Anti-dinitrophenol (DNP) IgE モノクローナル抗体 (SPE-7)、Anti-diphospho-ERK-1 & ERK-2 モノクローナル抗体、Anti-phospho-p38 抗体は Sigma-Aldrich 社から購入した。Anti-ERK-1 & ERK-2 モノクローナル抗体、Anti-SAPK/JNK モノクローナル抗体、Anti-p38 モノクローナル抗体、Anti-phospho-SAPK/JNK 抗体、Anti-phospho-FAK (Tyr 397) 抗体、Anti-Pyk2 抗体、Anti-phospho-Pyk2 (Tyr 402) 抗体、Anti-PLC γ 1 antibody、Anti-phospho-PLC γ 1 (Tyr 783) 抗体、Anti-Akt 抗体、Anti-phospho-Akt (Thr 308) 抗体は Cell Signaling Technology 社から購入した。Anti-Myc モノクローナル抗体、Anti- β -actin モノクローナル抗体、Anti-FAK 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。Anti-PTP-PEST 抗体と Anti-phospho-Ser39 PTP-PEST 抗体は当研究室で作成した (17)。Alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-rabbit IgG 抗体と AP-conjugated anti-mouse IgG 抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories 社から購入した。

3.2. 細胞及び刺激方法

ヒト胎児腎臓細胞由来の HEK-293 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)に加熱処理により非働化した Fetal Calf Serum (FCS) (10 %)、ペニシリン及びストレプトマイシン (各 50 μ g/ml)並びにネオマイシン(100 μ g/ml)を添加した培地を使用し、37°Cの CO₂ インキュベータ内で培養した。ラット好塩基球白血病細胞(RBL-2H3)はヒューマンサイエンス研究資源バンク(Osaka, Japan)から入手した。RBL-2H3 細胞は

Eagle's minimum essential medium (MEM) に加熱処理により非働化した FCS (10 %)、ペニシリン及びストレプトマイシン (各 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)並びにネオマイシン(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加した培地を使用し、37°Cの CO_2 インキュベータ内で培養した。RBL-2H3 細胞の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の架橋による刺激は 50 ng/ml の SPE-7 を添加した MEMで 37°Cにてオーバーナイトで培養した後、細胞の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ に結合しなかった SPE-7 を取り除き、多価抗原の DNP-human serum albumin (HSA)が 1-100 ng/ml の濃度で含まれる Tyrode's solution (10 mM HEPES buffer, pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCL, 1.4 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5.6 mM glucose, and 0.1 % bovine serum albumin)で 37°Cにて適切な時間それぞれ刺激を行った。その後、細胞を回収し、RT-PCR, イムノブロッティングなどの解析に使った。

3.3. プラスミドの作成及びトランスフェクション

動物細胞発現プラスミド pcDNA3.1 Myc/His に組み込んだ PTP-PEST wild-type (WT)と PTP-PEST 酵素領域(アミノ酸残基 1-300)はすでに報告したものである(17)。C231S (PTP-PEST CS) 及び S39A (PTP-PEST SA)は PCR を使用して作成した。変異の確認は Big Dye Terminator technology 及び Genetic Analyzer 3130 xi(共に Applied Biosystems, Foster City, CA)により行った。これらのプラスミドのサイトメガロウィルス (CMV)プロモーター領域をヒトポリペプチド鎖伸長因子遺伝子(EF1) プロモーターに置換したプラスミドは、pEF-Flag プラスミドの EF1 プロモーター領域を *Hind* III(平滑化)と *Xba* I で切断した DNA 断片を、*Bgl* II(平滑化)と *Xba* I で切断した pcDNA3.1 プラスミドに組み込んで作成した。

動物細胞への遺伝子の導入はエレクトロポレーション法により実施した。HEK-293 細胞は Cytomix electroporation buffer (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl_2 , 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 2 mM EGTA, 5mM MgCl_2 , 5 mM, reduced glutathione, 2 mM ATP, 25 mM HEPES; pH 7.6) 100 μl に細胞を懸濁し、10 μg のプラスミドを加え 0.2 cm キュベット中で Bio-Rad Gene Pulser Xcell System (Bio-Rad, Hercules, CA) の 293 プリセットプロトコル(Square wave モード, 110 V, 25 msec)で実施した。HEK-293 細胞はトランスフェクション後、48 時間以内に各種の実験に使った。RBL-2H3 細胞は Cytomix electroporation buffer 100 μl に細胞を懸濁し、10 μg のプラスミドを加え 0.2 cm キュベット中で Bio-Rad Gene Pulser Xcell System を用いて 190 V、20 msec にてトランスフェクションを行った。RBL-2H3 細胞は刺激後、24 時間以内に各種の実験に使った。

3.4. 脱顆粒の計測

RBL-2H3 細胞の脱顆粒は細胞内の顆粒に含まれる酵素の β -hexosaminidase の酵素活性を測定することによって求めた。RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の SPE-7 を含む MEM 中にてオーバーナイトで培養した。細胞の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ に結合していない SPE-7 の除いた後、50 ng/ml の DNP-HSA を含む Tyrode's solution で刺激を行った。その後、細胞上清液に含まれる細胞外に放出された β -hexosaminidase の酵素活性と、上清を除いた細胞を 1% Triton X-100 を含む Tyrode's solution により溶解し、細胞内に留まった β -hexosaminidase の酵素活性をそれぞれ測定した。 β -hexosaminidase の酵素活性は 5 mM の *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminide を含む 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5)で 37°C、60 分間反応させた後、0.1 M carbonate buffer (pH 11.0)を加

えることにより反応を停止させた。その後、酵素活性の反応生成物である *p*-nitrophenol を 405 nm における吸光度を計測することで定量した。脱顆粒は細胞上清液に含まれる酵素活性を細胞上清液及び細胞溶解液に含まれる酵素活性の和で除することで計算した。各サンプル 4 回ずつ計測を実施した。

3.5. イムノブロッティング法

様々な処理をした RBL-2H3 細胞を 1,000 x g で 5 分間遠心することで回収した。回収した細胞を Lysis buffer (10 mM Tris-HCl buffer, pH7.5, 1% Nonident P-40, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₄P₂O₇, 25 µg/ml benzoylsulfonylfluoride) に懸濁し、細胞をボルテックスで破砕した。細胞を破砕した溶液を 16,000 x g で 20 分間遠心することで不溶画分を取り除き、細胞抽出液とした。細胞抽出液を SDS-PAGE にて分画した後、PVDF 膜に電氣的に転写した。その後、PVDF 膜に結合したタンパク質を一次抗体と AP 結合二次抗体で処理し、一次抗体と反応するタンパク質を、蛍光基質である DDAO phosphate (9H-(1, 3-dichloro-9, 9-dimethylacridin-2-one-7-yl phosphate) (Molecular Probes, Eugene, OR) を使用して Typhoon 9210 (励起波長 633 nm, 蛍光フィルター, 670BP30) (GE Healthcare) にて検出した。得られたバンドの強度の定量には Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD) を使用した。

3.6. 脱リン酸化活性測定

HEK-293 細胞に PTP-PEST WT, CS 及び SA を一過的に過剰発現させた後、360

nM の TPA により 15 分処理を行った。TPA 処理した細胞及び非処理細胞(コントロール)を PBS 中で 30 秒間の超音波処理をして細胞を破碎した。不溶画分を 16,000 x g の遠心で除き、残った細胞抽出液に含まれる His/Myc-tagged PTP-PEST を Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)で Pull down した。Pull down した試料の半分はイムノブロットイング法により、PTP-PEST の検出に使用した。残り半分に試料に含まれる PTP 活性は *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP)を基質にして測定した。試料を 5 mM *p*NPP、150 mM NaCl、1mM DTT を含む 20 mM HEPES buffer (pH 7.0)で 37°C、10 分間反応させた後、酵素反応を 0.1 M carbonate buffer (pH 11.0)を添加して反応を止めた。反応生成物である *p*-nitrophenol を 405 nm の吸光度を測定して定量した。

3.7. リアルタイム RT-PCR

様々な処理をした RBL-2H3 中に含まれる全 RNA を RNAqueous RNA purification kit (Ambion, Austin, TX)により抽出した。その後、High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)を使用し、逆転写反応により cDNA を合成した。合成した cDNA を PTP-PEST、TNF- α 、IL-4、IL-13 及び β -actin に特異的な TaqMan プローブを使い、7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)で測定した。測定は TaqMan gene expression assays (PTP-PEST, RN00589060_m1; TNF- α , Rn00562055_m1; IL-4, RN01456866_m1; IL-13, Rn00587615_m1; β -actin, Rn00486990_m1)及び Universal PCR MasterMix (全て Applied Biosystems)を使用した。定量は β -actinを指標とした相対定量法($\Delta\Delta$ Ct 法)により行った(18)。各サンプル 4 回ずつ計測を実施した。

3.8. 統計解析

脱顆粒活性及びリアルタイム RT-PCR に関する統計解析はスチューデントの t 検定により実施した。

4. 結果

4.1. FcεRI 架橋による PTP-PEST の発現

これまでの研究からマスト細胞の抗原刺激による細胞内の活性化シグナルの伝達において PTK が重要な役割を担っていることが明らかになっている(19-21)。そこで、我々は PTP についても同様にマスト細胞の活性化シグナル伝達の制御に関与していると考え、マスト細胞の活性化シグナルを制御する PTP について検討した。多くの PTP の中から、本研究では接着細胞の細胞接着や細胞移動などの制御に関わると同時に、B 細胞や T 細胞において抗原受容体からのシグナル伝達を制御することが知られている PTP-PEST に注目した。最初に、RBL-2H3 細胞において PTP-PEST の mRNA が FcεRI 架橋により変動するかどうかを検討した。RBL-2H3 細胞を抗 DNP-IgE 抗体 (SPE-7)を含む MEM で一昼夜培養することにより、RBL-2H3 細胞の FcεRI に抗 DNA-IgE を結合させた後、DNP-HSA を用いて RBL-2H3 細胞の FcεRI を架橋して刺激を行った。刺激は 0 時間(非刺激)、0.5 時間、1 時間、3 時間及び 6 時間で行った。その後、刺激した各細胞から全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にて細胞内の PTP-PEST の mRNA 転写レベルの変化を検討した。その結果、PTP-PEST の mRNA は FcεRI 架橋により、6 時間を経過する時点まで直線的に上昇し、FcεRI 架橋前に比べ、その発現量は約 4 倍となった(図4)。これらの結果は、RBL-2H3 細胞の FcεRI 架橋後において、PTP-PEST が何らかの働きをしている可能性を示している。

4.2. PTP-PEST Ser39 の FcεRI 架橋によるリン酸化

先述のとおり、PTP-PEST は 39 番目のセリン残基(Ser39)がリン酸化されると、酵素

活性が負に制御されることが報告されている(7,17)。そこで、FcεRI を架橋した RBL-2H3 細胞において、PTP-PEST の Ser39 のリン酸化が起こるか否かについて検討を行った。His/Myc タグ付加 PTP-PEST WT を一過的に過剰発現させた RBL-2H3 細胞を、抗 DNP-IgE/DNP-HSA にて 0 分（非刺激）、5 分、10 分、30 分、60 分の間刺激した。その後、各細胞の細胞抽出液の PTP-PEST の Ser39 のリン酸化を、特異的抗体を使ったイムノブロッティング法で検討した。PTP-PEST WT の検出には抗 Myc 抗体、Ser39 のリン酸化の検出には当研究室で作成したリン酸化 Ser39 に特異的な抗体(抗 pS39 PEST 抗体)を使用した。その結果、PTP-PEST の Ser39 は非刺激の状態では、ほとんどリン酸化されていなかった。しかし、刺激後 5 分で速やかにリン酸化が亢進されかつ最大となり、その後経時的に緩やかに減衰し刺激後 1 時間で非刺激時と同等のレベルまで低減した(図 5)。

PTP-PEST の C 末端側の比較的長い非酵素領域は、様々なシグナル伝達に関与する分子が結合する“足場”として働いていると考えられている。そこで、FcεRI 架橋により誘導される PTP-PEST の Ser39 のリン酸化に、PTP-PEST の C 末端側の非酵素領域が関与しているかどうかを検討した。PTP-PEST の酵素領域（アミノ酸残基 1-300）(PTP-PEST1-300) を発現している RBL-2H3 細胞の FcεRI を架橋した。その後、細胞を回収し、PTP-PEST 1-300 の Ser39 のリン酸化をイムノブロッティング法により検討した。その結果、PTP-PEST 1-300 の Ser39 は、PTP-PEST WT 同様に非刺激の条件ではほとんどリン酸化されていなかった。FcεRI 架橋後、PTP-PEST WT と同様に Ser39 は5分で速やかにリン酸化された。しかし、PTP-PEST WT が時間とともに Ser39 のリン酸化の程度が減衰していくのに対し、PTP-PEST 1-300 は少なくとも刺激後 1 時間ま

でリン酸化の程度が維持されていた。これらの結果は、FcεRI 架橋後の Ser39 のリン酸化には、PTP-PEST の非酵素領域は関与していないが、5 分後の Ser39 のリン酸化の抑制には PTP-PEST の非酵素領域が重要な役割を担っている可能性を示している。

我々は過去に PTP-PEST の酵素活性は、抗 pS39-PEST 抗体を使ったイムノブロッティング法で得られるバンドの濃さに強く負の相関があることを明らかにしている(17)。従って、マスト細胞の FcεRI が架橋されると、PTP-PEST の Ser39 がリン酸化されることは、FcεRI 架橋により PTP-PEST の酵素活性が低下することを示している。RBL-2H3 細胞において FcεRI 架橋により、PTP-PEST の発現上昇と Ser39 のリン酸化による酵素活性の抑制が誘導されることは、PTP-PEST がマスト細胞の活性化シグナルを複雑に制御している可能性を示している。

そこで、我々は PTP-PEST の酵素活性に必須の 231 番目のシステイン残基をセリン残基に置換することで酵素活性を欠失させた変異酵素(PTP-PEST CS)、及び、PTP-PEST がリン酸化を受けることで酵素活性を負に制御される 39 番目のセリン残基をアラニン残基に置換し、恒常的に酵素活性を維持することができる変異酵素(PTP-PEST SA)を発現するようなベクターを作成した。PTP-PEST の Ser39 は Protein kinase C (PKC) の活性化試薬である Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) でリン酸化され、酵素活性が抑制されることが知られているので、PTP-PEST WT、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA をそれぞれ発現させた HEK-293 細胞を TPA で処理した。その後、それぞれの細胞を超音波により破碎し細胞抽出液を作成した。各 PTP-PEST 発現ベクターは His/Myc-tag を付与して発現するように設計されているので Pull down 法により細胞抽出液中から各 PTP-PEST (WT, CS 及び SA)を部分精製した。その後、部分精製

したサンプルを用い PTP-PEST の Ser39 のリン酸化をイムノブロッティング法で調べると同時に、PTP-PEST の酵素活性を *p*NPP を基質として測定した(図6)。その結果、PTP-PEST WT 及び PTP-PEST CS の Ser39 は TPA 処理によりリン酸化が亢進されたが、PTP-PEST SA では Ser39 のリン酸化は確認されなかった。また、PTP-PEST WT の酵素活性は TPA 処理により有意に抑制されていた。一方、PTP-PEST CS は Ser39 のリン酸化の有無にかかわらず酵素活性は検出できなかった。更に、PTP-PEST SA は Ser39 がアラニン残基に置換されているため当該部位におけるリン酸化は起こらず、TPA 処理に関わらず十分な酵素活性を有していた。これらの結果から、PTP-PEST CS は常不活性型の変異酵素、PTP-PEST SA は常活性型の変異酵素であることが確認された。

4.3. FcεRI 架橋による RBL-2H3 細胞の脱顆粒活性における PTP-PEST の制御

これまでの検討から PTP-PEST がマスト細胞における FcεRI 架橋による抗原シグナルを制御している可能性が示唆されたため、先述の常不活性型の変異酵素 PTP-PEST CS と常活性型の変異酵素 PTP-PEST SA を一過的に RBL-2H3 細胞に過剰発現させ、マスト細胞の活性化シグナルの伝達における PTP-PEST の役割を検討した。

最初に、mock 処理した RBL-2H3 細胞、PTP-PEST CS あるいは PTP-PEST SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞の PTP-PEST の発現レベルをイムノブロッティング法で検討した。その結果、mock 処理した細胞の抽出液の結果から、RBL-2H3 細胞の内在性の PTP-PEST の発現量は、本研究に使った抗 PTP-PEST 抗体ではわずかに検出

できる程度であった。それに対して、外来性の PTP-PEST CS あるいは SA の発現量は、内在性の PTP-PEST の発現量に比べ、10 倍以上の発現していることが分かった(図7-A)。なお、mock 処理した RBL-2H3 細胞と空のベクターをトランスフェクションした細胞における内在性の PTP-PEST の発現量は同等であった(データ非表示)。以上の結果を踏まえ、今後の実験では上記の条件で実験を行った。

次に、mock 処理した RBL-2H3 細胞、および PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞の FcεRI 架橋で誘導される脱顆粒を調べた。それぞれの RBL-2H3 細胞の FcεRI に抗 DNP-IgE を結合させた後、0 分(未架橋)、30 分、60 分間 DNP-HSA を加えて FcεRI を架橋した。それぞれの細胞において、細胞外に放出されたβ-hexosaminidase 活性を指標として脱顆粒を測定した。その結果、常不活性型の変異酵素 PTP-PEST CS と常活性型の変異酵素 PTP-PEST SA が過剰発現している細胞の脱顆粒は、共に mock 処理した細胞の脱顆粒よりも低かった(図7-B)。これらの結果は PTP-PEST が FcεRI 架橋によって誘導される脱顆粒を負に制御するが、この負の制御には PTP-PEST の酵素活性を必要としないことが分かった。

4.4. FcεRI 架橋による RBL-2H3 細胞のサイトカイン転写活性における PTP-PEST の制御

次に、FcεRI 架橋による RBL-2H3 細胞が産生するサイトカインの転写活性が PTP-PEST によって制御されているかどうかを検討した。mock 処理した RBL-2H3 細胞、および PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞の FcεRI に抗 DNP-IgE を結合

させた後、0 分(未架橋)、30 分、60 分間 DNP-HSA を加えて FcεRI を架橋して刺激をした。それぞれの細胞から全 RNA を抽出し、FcεRI 架橋により発現が誘導されることが知られている炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α (TNF- α)と Th2 型サイトカインの interleukin (IL)-4 や IL-13 の mRNA 量を特異的 TaqMan プローブによるリアルタイム RT-PCR 法で測定した(図 8)。なお、内在性コントロールとして β -actin を使用した。

その結果、mock 処理した RBL-2H3 細胞の FcεRI を架橋すると、TNF- α 、IL-4 及び IL-13 の mRNA 転写量は全ての細胞において刺激後 1 時間まで経時的に増加していた。また、PTP-PEST SA が過剰発現している細胞の TNF- α の mRNA 量は mock 処理した細胞に比べ、有意に亢進していた。しかし、PTP-PEST CS を過剰発現している細胞の TNF- α の mRNA 量は mock 処理した細胞の TNF- α 量に比べ、明らかに抑制されていた。これらの結果から、PTP-PEST は FcεRI 架橋によって誘導される TNF- α の転写を正に制御するが、PTP-PEST による TNF- α の転写の制御には PTP-PEST の酵素活性が必要であることが明らかとなった。

一方、IL-4 及び IL-13 の転写について見ると、mock 処理した細胞の IL-4 と IL-13 の mRNA 量に比べ、PTP-PEST CS を過剰発現させた細胞と PTP-PEST SA を過剰発現させた細胞の FcεRI 架橋により誘導される IL-4 と IL-13 の転写量は、共に亢進していた。FcεRI を架橋した PTP-PEST CS 過剰発現細胞の IL-4 の転写量は、mock 処理した細胞に比べ、非架橋と架橋後 30 分と 60 分で、約 2 倍上昇していた。一方、PTP-PEST SA 過剰発現細胞においては、非架橋と架橋後 30 分で約 2 倍、架橋後 60 分で約 3 倍上昇していた。

次に FcεRI の架橋により発現誘導を受ける IL-13 について調べた。PTP-PEST CS

過剰発現細胞及び PTP-PEST SA 過剰発現細胞の FcεRI を架橋し、IL-13 の転写量を mock 処理した細胞と比較すると、PTP-PEST CS 過剰発現細胞においては、非架橋条件下においても IL-13 の転写が約 3.5 倍に上昇していた。FcεRI 架橋後においては、更に IL-13 の転写量の上昇が見られた。同様に、PTP-PEST SA 過剰発現細胞においても、PTP-PEST CS 過剰発現させた細胞と同様に非刺激の状態で、ある程度の mRNA レベルの上昇が見られたが、刺激時間に比例して更に上昇していた。これらの結果から、PTP-PEST は IL-4, IL-13 の転写を正に制御しており、その制御は PTP-PEST の酵素活性に依存しないことが明らかになった。また、IL-4 と IL-13 における刺激後の mRNA レベル変化の挙動が異なることから、PTP-PEST による IL-4 と IL-13 の転写の制御機構は異なっている可能性が示唆された。

4.5. FcεRI 架橋による RBL-2H3 細胞内シグナル伝達における PTP-PEST の制御する分子の検討

PTP-PEST が RBL-2H3 細胞の FcεRI 架橋によって誘導される脱顆粒と TNF-α、IL-4、IL-13 サイトカイン遺伝子の転写を制御することが分かったので、架橋された FcεRI からのシグナル伝達において、PTP-PEST が制御するシグナル分子の同定を検討した。

最初に、マスト細胞のサイトカイン遺伝子の転写に重要なシグナル分子である MAP キナーゼの活性化について検討した。mock 処理した細胞と、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞を抗 DNP IgE/DNP-HSA にて 0 分(非刺激)と 5 分刺激を行った後、それぞれの細胞の細胞抽出液を主要な MAP キナーゼである ERK (Extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase)、p38 MAPK に特異的な抗体を使

ったイムノブロッティング法で、それぞれの MAP キナーゼの活性化を調べた(図 9)。その結果、mock 処理をした細胞と PTP-PEST CS、PTP-PEST SA を過剰発現させた細胞の間で、FcεRI 架橋による3種の MAP キナーゼの活性化に大きな変化は見られなかった。これらの結果から、PTP-PEST は RBL-2H3 細胞の MAP キナーゼ活性化に関与していないことが示された。

次に、MAP キナーゼと同様にマスト細胞の FcεRI 架橋後のサイトカインの転写の制御に関わると考えられている Akt/protein kinase B (PKB)の活性化について検討した(図 10)。mock 処理した細胞と、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞を抗 DNP IgE/DNP-HSA にて 0 分 (非刺激)と 5 分刺激を行った後、それぞれの細胞の細胞抽出液をイムノブロッティング法で調べた。その結果、本実験に使った RBL-2H3 細胞では Akt は FcεRI を架橋する前から活性化状態であることが分かった。Akt の活性化は mock 処理や PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させても変化しなかった。

また、マスト細胞の FcεRI 架橋後の脱顆粒に至るシグナルを制御していると考えられている phospholipase C γ 1 (PLC γ 1)の活性化について検討した。mock 処理した細胞と、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞を抗 DNP IgE/DNP-HSA にて 0 分 (非刺激)と 5 分刺激を行った後、それぞれの細胞の細胞抽出液をイムノブロッティング法で調べた。その結果、mock 処理をした細胞に比べ、PTP-PEST CS あるいは PTP-PEST SA を過剰発現させた細胞において、有意に PLC γ 1 の Tyr783 のリン酸化が抑制されていた(図 11)。PLC γ 1 は自身の Tyr783 がリン酸化されると活性化することが知られている。よって、PTP-PEST は FcεRI 架橋によって活性化を受ける PLC γ 1 の活性化を抑制することが明らかとなった。さらに、この PLC γ 1 の活性化の抑制は、

PTP-PEST CS と SA の両酵素の過剰発現で見られることから、この PTP-PEST による PLC γ 1 の活性化の抑制には酵素活性は必要ないことが分かった。

最後に、B 細胞や T 細胞などにおいて、PTP-PEST の基質であることが報告されている Focal Adhesion kinase (FAK) と Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) が RBL-2H3 細胞において基質になっているかどうかを検討した。mock 処理した細胞と、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞を、抗 DNP IgE/DNP-HSA にて 0 分 (非刺激) と 5 分刺激を行った後、それぞれの細胞の細胞抽出液をイムノブロッティング法で調べた。その結果、mock 処理をした細胞と PTP-PEST CS、PTP-PEST SA を過剰発現させた細胞の間で、Fc ϵ RI 架橋による Pyk2 の Tyr402 のリン酸化には大きな変化は見られなかった (図 12)。Pyk2 の Tyr402 のリン酸化は Pyk2 の活性化の指標となることから、PTP-PEST は Fc ϵ RI 架橋後の Pyk2 の活性化には関わっていないことがわかった。また、Fc ϵ RI 架橋により活性化を受けて Tyr397 がリン酸化される FAK は、mock 処理をした細胞に比べ、PTP-PEST CS あるいは PTP-PEST SA を過剰発現させた細胞において、有意に Tyr397 のリン酸化が抑制されていた。この結果は、Fc ϵ RI 架橋後の FAK の活性化を PTP-PEST が抑制していることを示している。Fc ϵ RI 架橋による FAK の活性化は、PTP-PEST CS と SA の両酵素によって抑制されることから、PLC γ 1 と同様に FAK の活性化の抑制には PTP-PEST の酵素活性は必要なかった。また、PLC γ 1 も FAK もチロシン残基のリン酸化が PTP-PEST により抑制されるが、PTP-PEST CS においても抑制されることから、この 2 つの分子は PTP-PEST の基質ではなく、PTP-PEST は PLC γ 1 あるいは FAK の活性化に至るシグナル経路を抑制していると可能性が高い。

5. 考察

本研究の前半では PTP-PEST のマスト細胞の抗原刺激による細胞内シグナル伝達への関与について検討を行った。その結果、PTP-PEST は FcεRI 架橋による刺激にตอบสนองして PTP-PEST の mRNA 量が経時的に上昇すると同時に、Ser39 が刺激後 5 分をピークにリン酸化されて酵素活性が抑制されることを明らかにした。また、PTP-PEST を RBL-2H3 細胞で過剰発現させた実験から、PTP-PEST は FcεRI 架橋により誘導される脱顆粒やサイトカインの転写の制御に関与していることが示唆された。

後半においては、PTP-PEST が FcεRI 架橋によるマスト細胞活性化シグナルのどのシグナル経路を制御しているかどうかを、代表的な経路である MAP キナーゼ経路、PLCγ1/Ca²⁺/PKC 経路及び PI3 キナーゼ/Akt 経路、並びに T 細胞や B 細胞などの免疫担当細胞において、PTP-PEST の基質である FAK や Pyk2 について検討したところ、PTP-PEST は FAK 及び PLCγ1 の活性化を負に制御していた。以下に本研究結果を踏まえた考察を述べる。

5.1. マスト細胞の抗原刺激による細胞内シグナル伝達への PTP-PEST の関与

本研究の結果から、ラットのマスト細胞株である RBL-2H3 細胞において、FcεRI 架橋による抗原刺激にตอบสนองして PTP-PEST の転写量が、少なくとも刺激後6時間までの間直線的に上昇することが分かった。マスト細胞の FcεRI 架橋にตอบสนองして PTP-PEST の転写量が上昇することは、PTP-PEST がマスト細胞活性化シグナルの制御に関与している可能性を強く示唆している。一方、抗原刺激を受けていない RBL-2H3 細胞の

PTP-PEST は、酵素活性が負に制御される Ser39 のリン酸化はほとんど受けていなかった。しかし、FcεRI の架橋により5分をピークに Ser39 がリン酸化され、酵素活性が抑制されることがわかった。以上のように FcεRI を架橋した RBL-2H3 細胞の PTP-PEST は、発現量と酵素活性が複雑に制御されていることが分かった。そこで、マスト細胞の FcεRI 架橋による活性化における PTP-PEST の機能を解明するために、常不活性変異酵素 PTP-PEST CS と常活性変異酵素 PTP-PEST SA を使って実験を行った。その結果、PTP-PEST は FcεRI 架橋で誘導される脱顆粒を負に制御し、IL-4 と IL-13 の転写を正に制御した。PTP-PEST による脱顆粒の抑制と IL-4 と IL-13 の転写促進には、PTP-PEST の酵素活性を必要としないことが分かった。PTP-PEST の C 末端側にある比較的長い非酵素領域に様々なシグナル分子が結合する“足場”として働いていることが知られているので、PTP-PEST の酵素活性に依存しないこれらの制御には、PTP-PEST の C 末端側の非酵素領域に結合する分子が関わっている可能性が高い。また、FcεRI 架橋により TNF-α の転写誘導は PTP-PEST の酵素活性によって制御されていることがわかった。これらの結果から、PTP-PEST は RBL-2H3 細胞の FcεRI 架橋による活性化シグナルを、少なくとも2つの方法で制御していることが明らかとなった。一つは、PTP-PEST の酵素活性に依存しない制御であり、もう一つは PTP-PEST の酵素活性に依存した制御である。

今まで、接着細胞や B 細胞、T 細胞で PTP-PEST の機能が研究されてきた。B 細胞においては、PTP-PEST は Ras 経路を抑制し、Shc、FAK、Cas を脱リン酸化することで B 細胞の抗原受容体からのシグナルを制御していると報告されている(6)。また、T 細胞においては、PTP-PEST は Pyk2 や Src 型 PTK を脱リン酸化し、T 細胞の二次反

応を制御することが報告されている(14-16)。これらの研究から、B 細胞や T 細胞における PTP-PEST の機能は、その酵素活性と強くリンクしていることが明らかになっている。今回、RBL-2H3 細胞において、PTP-PEST が酵素活性を通じて TNF- α の転写活性を制御すると同時に、酵素活性に関係なく脱顆粒や IL-4 と IL-13 の転写活性を制御することを明らかにできたことは、とても興味深い。

細胞質型 PTP で、酵素活性の制御が知られている PTP は非常に少なく、PTP-PEST はその数少ない中の 1 つである。しかし、PTP-PEST の酵素活性が PKC や cAMP-dependent protein kinase (PKA)の活性化試薬によって Ser39 がリン酸化され、基質に対する結合能の低下によって酵素活性が抑制されることが、1994 年に報告されて以来(7)、その Ser39 のリン酸化による PTP-PEST の酵素活性の制御の生理的な役割はほとんど分かっていなかった。現在、Fc ϵ RI を架橋した RBL-2H3 細胞において PTP-PEST の Ser39 をリン酸化する酵素は同定できていないが、Fc ϵ RI 架橋により PKC が活性化することが報告されているので、PKC が Ser39 のリン酸化を触媒している可能性が高い。また、PTP-PEST の Ser39 は Fc ϵ RI 架橋後約5分をピークに、その後脱リン酸化される。しかし、PTP-PEST の C 末端側の非酵素領域を欠く PTP-PEST を使うと、全長の PTP-PEST と同様に Fc ϵ RI 架橋後、速やかに Ser39 がリン酸化されるが、そのリン酸化は少なくとも1時間は持続されていた。この結果は、Fc ϵ RI 架橋後5分をピークに起こる Ser39 のリン酸化が脱リン酸化されるためには C 末端側の非酵素領域が重要であることを示している。当研究室はセリン・トレオニンホスファターゼの1つである Protein phosphatase 1 α (PP1 α)が、PTP-PEST の C 末端側の非酵素領域と相互作用し、Ser39 のリン酸化を抑制することを報告してきた(17)。この報告と今回の結果

を考えると、RBL-2H3 細胞において Ser39 の脱リン酸化には PP1 α が関与している可能性が高い。RBL-2H3 細胞において、PTP-PEST の Ser39 をリン酸化する酵素と脱リン酸化する酵素を、特異的阻害剤や siRNA などの方法により同定することが今後の課題の1つである。

5.2. マスト細胞の抗原刺激によるシグナル伝達において PTP-PEST が制御する分子の検討

PTP-PEST が酵素活性依存的な機構と酵素活性非依存的な機構で、マスト細胞の活性化シグナルを制御していることを明らかにすることができた。そこで、PTP-PEST が制御する主なシグナル分子を検討したところ、サイトカインの転写活性を制御していると考えられている MAP キナーゼと Akt の活性化の制御には PTP-PEST は関与していなかった。さらに、T 細胞において PTP-PEST の基質と報告されている Pyk2 の活性の制御についても PTP-PEST は関わっていないことがわかった。しかし、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や PKC の活性化を誘導する PLC γ 1 と、B 細胞で PTP-PEST の基質であると報告されている FAK の Fc ϵ RI 架橋による活性化が、PTP-PEST CS および SA の過剰発現によって抑制された。PLC γ 1 と FAK はチロシン残基のリン酸化によって活性化を受けるが、RBL-2H3 細胞において、PTP-PEST CS と SA の両酵素によって抑制されていることから、PLC γ 1 と FAK は PTP-PEST の直接的な基質ではなく、PLC γ 1 と FAK の活性化に至るシグナルを PTP 活性に関係なく抑制していることを示している。このことから RBL-2H3 細胞において PLC γ 1 と FAK の活性化の制御は PTP-PEST の酵素活性非依存的な制御機構に関わっている可能性が高い。PLC γ 1 と FAK はマスト細胞の

脱顆粒を誘導するシグナル経路を制御する重要な酵素であることが報告されている(22,23)ことから、PTP-PEST は PLC γ 1 と FAK の活性化を制御することによって脱顆粒を制御していると考えられる。しかし、どのようにして PTP-PEST が酵素活性に関係なく PLC γ 1 と FAK の活性化を制御しているかは不明である。そのためには、PTP-PEST の非酵素領域と結合する分子に着目して、その作用機構を解明する必要がある。また、PTP-PEST による TNF- α 、IL-4、IL-13 遺伝子の転写活性の制御機構に関わる分子は全く分かっていない。PTP-PEST はこれらのサイトカイン遺伝子の転写を制御することが報告されている MAP キナーゼ経路と PI3 キナーゼ/Akt 経路を制御していないことから PTP-PEST は他のシグナル経路を介して、これらのサイトカインの転写を制御していることが考えられる。PTP-PEST によるこれらサイトカイン遺伝子の転写活性の制御に関わる分子を明らかにすることが今後の課題である。

5.3. 結論

以上をまとめると、(1)PTP-PEST はラットのマスト細胞 RBL-2H3 において、FcεRI 架橋により、発現量が増加すると同時に Ser39 のリン酸化を受け、酵素活性が負に制御されることが分かった。(2) PTP-PEST は RBL-2H3 細胞において FcεRI 架橋による活性化シグナルを酵素活性非依存的と酵素活性依存的の 2 つの機構により制御していることが明らかになった。PTP-PEST の酵素活性に依存したシグナルの制御の例は多く報告されているが、PTP-PEST が酵素活性非依存的にシグナルを制御するという報告はなく、本研究が最初の報告である。しかし、PTP-PEST の酵素活性依存的と非依存的の制御機構に関わる分子が明らかにされていないので、これらの分子を明らかにし、その分子機構を解明することが今後の課題である。

6. 参考文献

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Saunders;
2. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2006 Mar;6(3):218-30.
3. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):773-86.
4. Mustelin T, Vang T, Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jan;5(1):43-57.
5. Matthews RJ, Bowne DB, Flores E, Thomas ML. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol.* 1992 May;12(5):2396-405.
6. Davidson D, Veillette a. PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates. *EMBO J.* 2001 Jul;20(13):3414-26.
7. Garton AJ, Tonks NK. PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *EMBO J.* 1994 Aug;13(16):3763-71.
8. Garton a J, Flint a J, Tonks NK. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol.* 1996 Nov;16(11):6408-18.
9. Garton a J, Tonks NK. Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *J Biol Chem.* 1999 Feb;274(6):3811-8.
10. Sastry SK. PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *J Cell Sci.* 2002 Nov;115(22):4305-16.
11. Brown MC, Turner CE. Roles for the tubulin- and PTP-PEST-binding paxillin LIM domains in cell adhesion and motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Jul;34(7):855-63.

12. Angers-Loustau a, Côté JF, Charest a, Dowbenko D, Spencer S, Lasky L a, et al. Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1999 Mar;144(5):1019-31.
13. Chellaiah M a, Kuppuswamy D, Lasky L, Linder S. Phosphorylation of a Wiscott-Aldrich syndrome protein-associated signal complex is critical in osteoclast bone resorption. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):10104-16.
14. Badour K, Zhang J, Shi F, Leng Y, Collins M, Siminovitch K a. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J Exp Med.* 2004 Jan 5;199(1):99-112.
15. Arimura Y, Vang T, Tautz L, Williams S, Mustelin T. TCR-induced downregulation of protein tyrosine phosphatase PEST augments secondary T cell responses. *Mol Immunol.* 2008 Jun;45(11):3074-84.
16. Davidson D, Shi X, Zhong M-C, Rhee I, Veillette A. The phosphatase PTP-PEST promotes secondary T cell responses by dephosphorylating the protein tyrosine kinase Pyk2. *Immunity.* 2010 Aug 27;33(2):167-80.
17. Nakamura K, Palmer HEF, Ozawa T, Mashima K. Protein phosphatase 1alpha associates with protein tyrosine phosphatase-PEST inducing dephosphorylation of phospho-serine 39. *J Biochem.* 2010 Apr;147(4):493-500.
18. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods.* 2001 Dec;25(4):409-18.
19. Paolini R, Jouvin MH, Kinet JP. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature.* 1991 Oct 31;353(6347):855-8.
20. Li W, Deanin GG, Margolis B, Schlessinger J, Oliver JM. Fc epsilon R1-mediated tyrosine phosphorylation of multiple proteins, including phospholipase C gamma 1 and the receptor beta gamma 2 complex, in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. *Mol Cell Biol.* 1992 Jul;12(7):3176-82.
21. Jouvin MH, Adamczewski M, Numerof R, Letourneur O, Vallé A, Kinet JP. Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J Biol Chem.* 1994 Feb 25;269(8):5918-25.

22. Zhang X, Chattopadhyay a, Ji QS, Owen JD, Ruest PJ, Carpenter G, et al. Focal adhesion kinase promotes phospholipase C- γ 1 activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 3;96(16):9021-6.
23. Hamawy MM. Reconstitution of High Affinity IgE Receptor-mediated Secretion By Transfecting Protein Tyrosine Kinase pp125FAK. J Biol Chem. 1997 Nov 28;272(48):30498-503.

図およびその説明

図 1 マスト細胞内におけるシグナル伝達の概略

現在において、一般的に受け入れられているマスト細胞活性化シグナルの概要
(文献3を参考に作成)

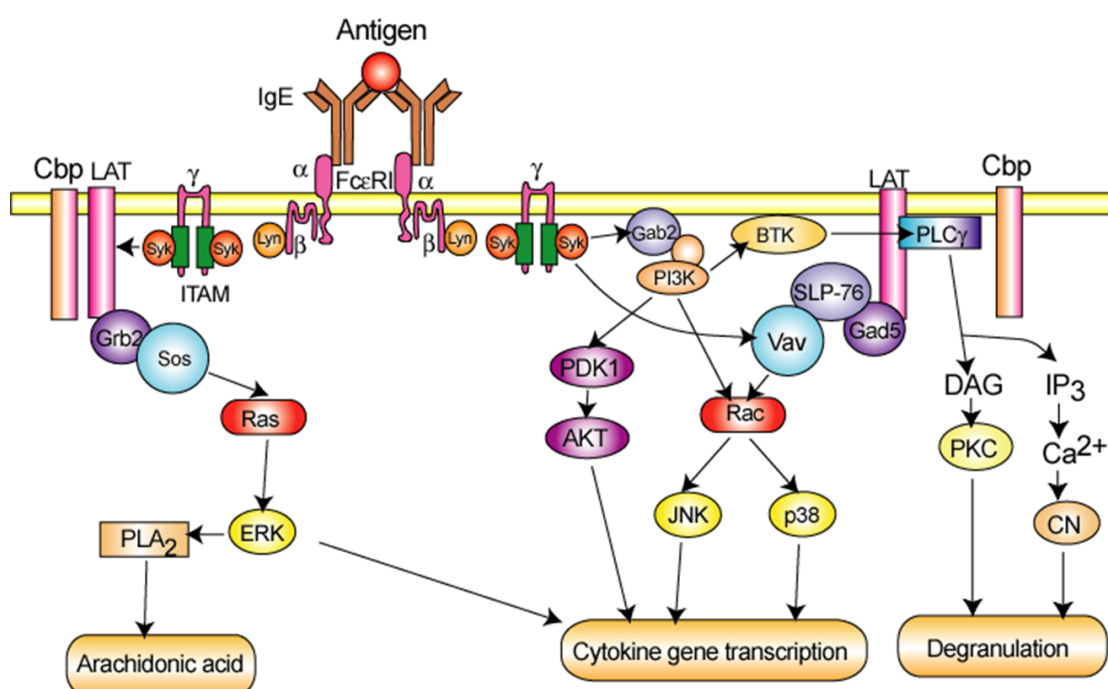


図 2 タンパク質チロシンキナーゼとタンパク質チロシンホスファターゼ

タンパク質のチロシン残基のリン酸化・脱リン酸化は、チロシン残基特異的なタンパク質チロシンリン酸化酵素(タンパク質チロシンキナーゼ、PTK)とタンパク質チロシン脱リン酸化酵素(タンパク質チロシンホスファターゼ、PTP)によって制御されている。

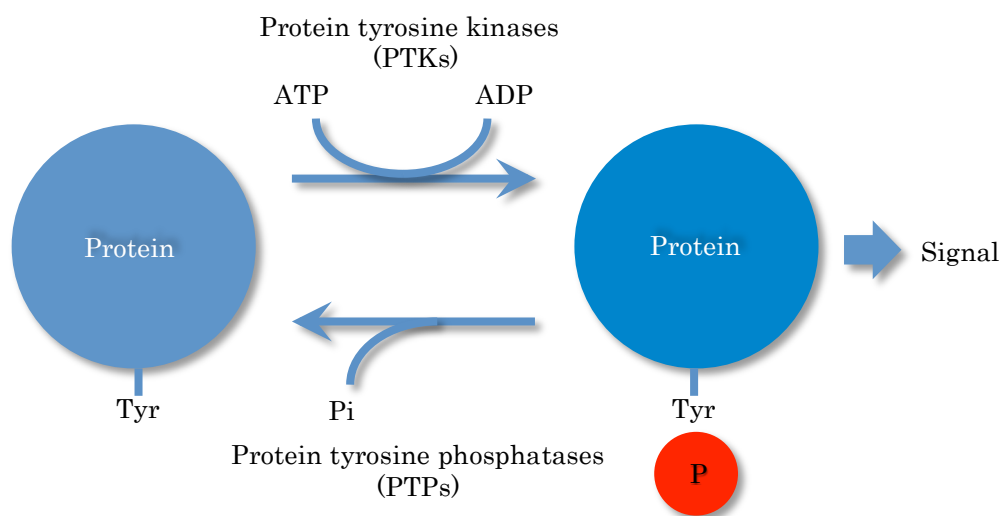


図 3 PTP-PEST の構造

PTP-PEST は N 末端側に酵素領域 (Catalytic domain; 青色)、C 末端側に比較的長い非酵素領域を持つ。非酵素領域にはタンパク質間相互作用に関わるプロリンに富む領域(Pro-rich domain; オレンジ色)が 5 箇所、分子の寿命に関係すると考えられているプロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニンに富む領域(PEST motif; 赤色)が 4 箇所存在する。また、Ser39 は PKC や PKA によってリン酸化を受け、酵素活性が負に制御される。Cys231 は PTP-PEST の酵素活性の必須なアミノ酸残基である。

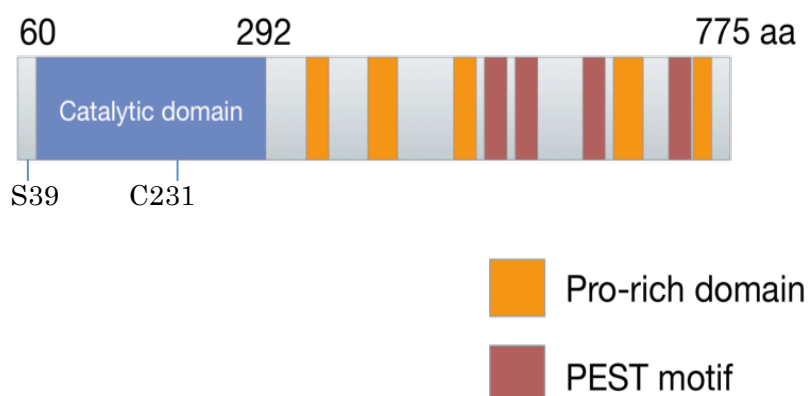


図 4 FcεRI架橋による PTP-PEST の発現

刺激する前日に 50 ng/ml の抗 DNP-IgE 抗体(SPE-7)存在下で培養した RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA で 0 分、0.5 時間、1 時間、3 時間、6 時間刺激した。それぞれの細胞から全 RNA を抽出し、ラットの PTP-PEST 及び β -actin (内在性コントロール)に特異的な TaqMan プローブを使い、リアルタイム RT-PCR で PTP-PEST の mRNA 量を定量した。 β -actin を指標とした相対定量法により 0 分を”1”とした時の各刺激時間における PTP-PEST mRNA の相対量をグラフに示した。それぞれ 4 サンプルの計測を行い、平均値 \pm 標準偏差をグラフにした。

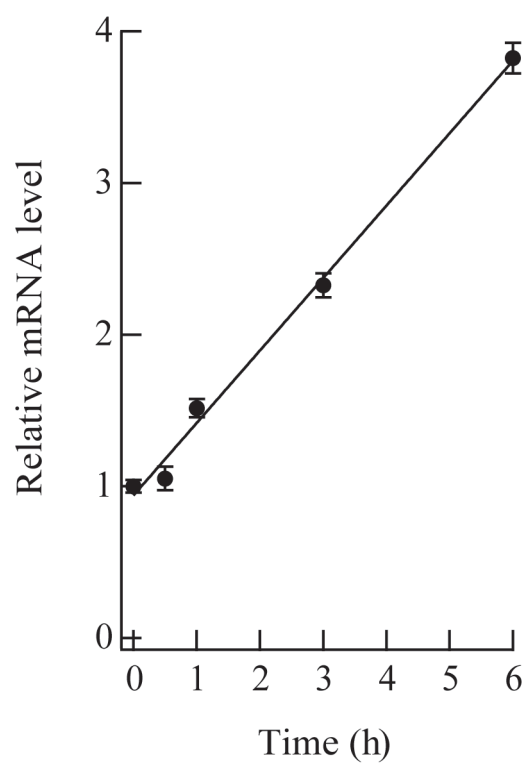


図 5 PTP-PEST Ser39 の FcεRI 架橋によるリン酸化

PTP-PEST の全長 (PTP-PEST WT) 及び PTP-PEST の酵素領域 (PTP-PEST amino acids 1-300) をそれぞれ過剰発現させた RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の抗 DNP-IgE 抗体(SPE-7)存在下で培養した後、50 ng/ml の DNP-HSA で 0 分、5 分、10 分、30 分、60 分間刺激した。それぞれの細胞の細胞抽出液を抗 Myc 抗体と抗 pS39-PEST 抗体を使って、イムノブロッティング法で検討した。(A) と(C) の上部のパネルは、それぞれ抗 Myc 抗体で検出された PTP-PEST WT と PTP-PEST amino acids 1-300 を示し、下部のパネルは抗 pS39-PEST 抗体で検出された PTP-PEST の Ser39 のリン酸化を示している。(B) と (D) は (A) と(C) のブロットを定量した後、Ser39 の相対的なリン酸化をグラフ化したものである。

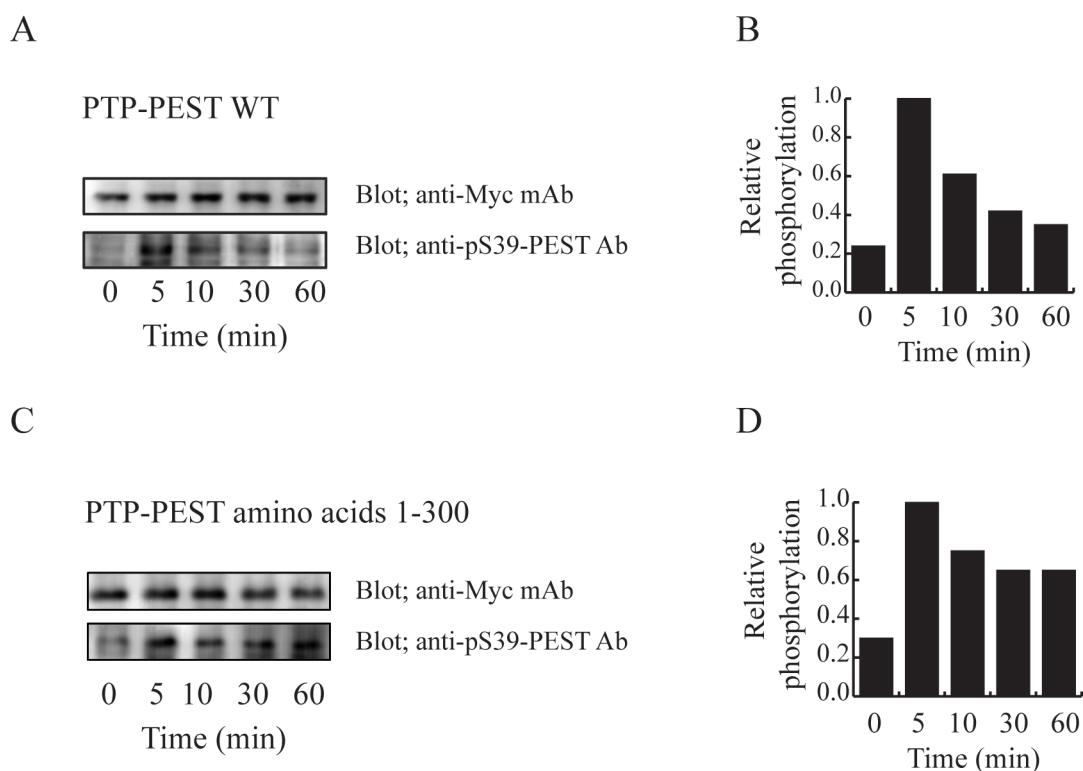


図 6 PTP-PEST WT、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA の Ser39 リン酸化及び酵素活性の制御

PTP-PEST WT、PTP-PEST CS、PTP-PEST SA (A) をそれぞれ発現させた HEK-293 細胞を 2 時間血清を含まない培地で培養した後、0 ng/ml (-) と 360 ng/ml (+) の TPA で 15 分間処理をした。それぞれの細胞抽出液から His-tag が付加されている PTP-PEST を Ni-Sepharose でプルダウンした。プルダウンされた試料を半分に分け、一方はイムノブロットリング法により PTP-PEST の Ser39 のリン酸化を定量した (B)。残りの半分は *p*NPP を基質にして PTP-PEST の酵素活性を測定した (C)。(B) の上のパネルは抗 PTP-PEST 抗体で検出された PTP-PEST を示し、下のパネルは抗 pS39-PEST 抗体で検出された Ser39 のリン酸化を示している。

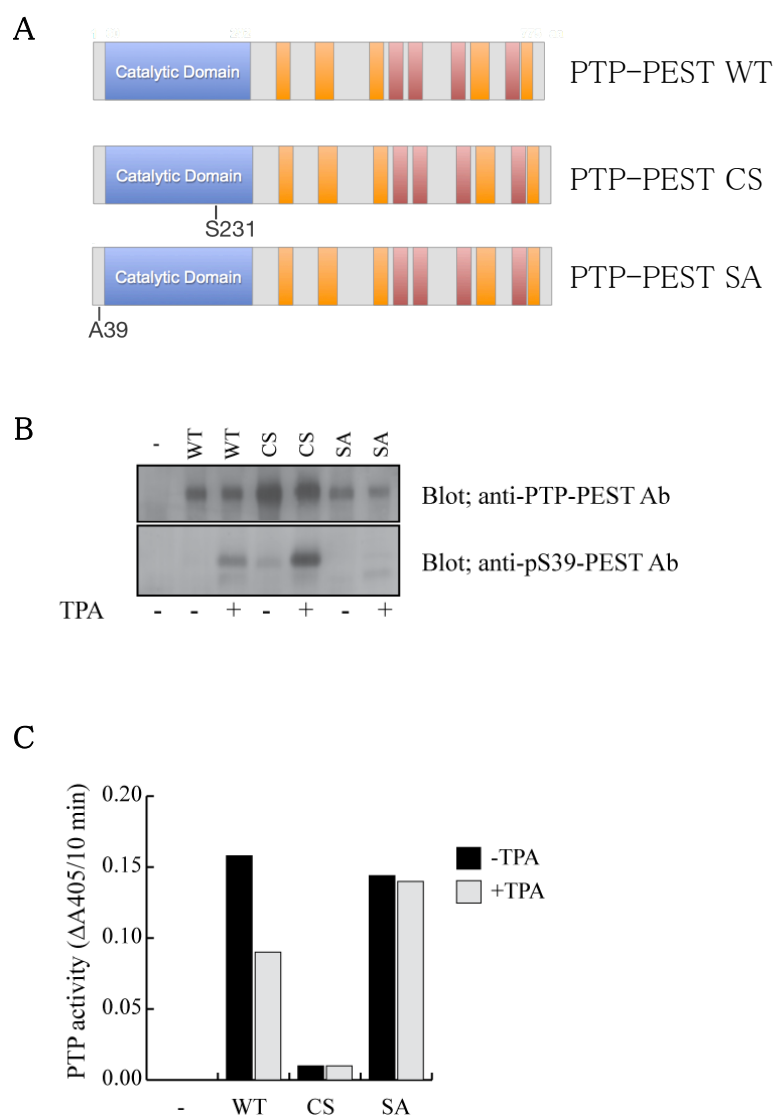
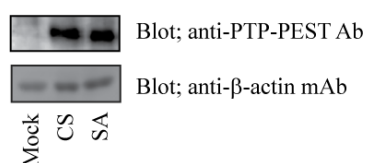


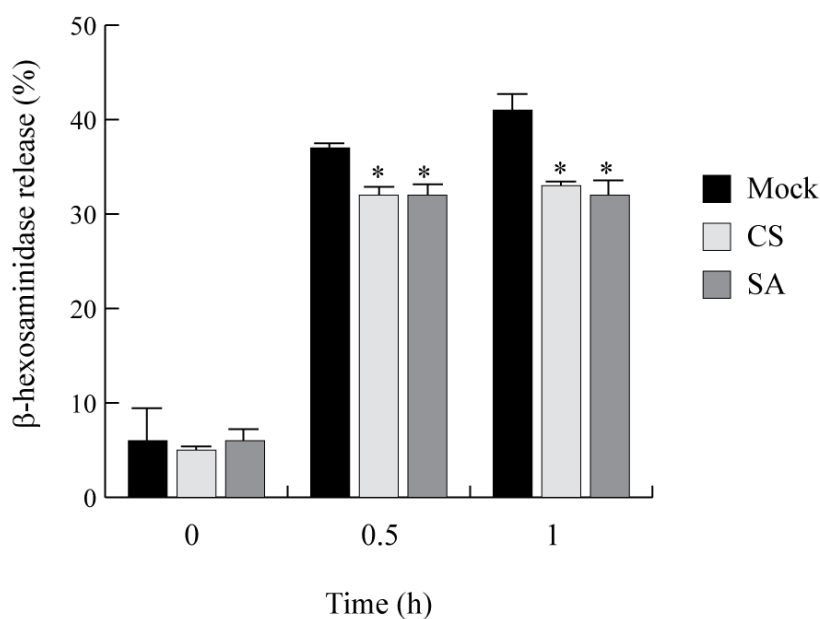
図 7 RBL-2H3 の脱顆粒活性における PTP-PEST CS、PTP-PEST SA の制御

(A) Mock 処理をした RBL-2H3 細胞と PTP-PEST CS あるいは PTP-PEST SA を過剰発現させた RBL-2H3 細胞の細胞抽出液を抗 PTP-PEST 抗体 (上のパネル) と抗 β -actin 抗体 (下のパネル) を使ったイムノブロッティング法で、PTP-PEST と β -actin を検出した。(B) (A) と同じ条件で、mock 処理した細胞 (黒色) と PTP-PEST CS (薄い灰色) あるいは SA (濃い灰色) を過剰発現させた細胞を、50 ng/ml SPE-7 を含む培地で培養した後、RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA を用いて 0 分、30 分、60 分間刺激を行った。それぞれの細胞の顆粒に含まれる β -hexosaminidase と培地中に放出された β -hexosaminidase から脱顆粒を計算した。それぞれ 4 サンプルずつ計測し、平均値 \pm 標準偏差をグラフにした。

A



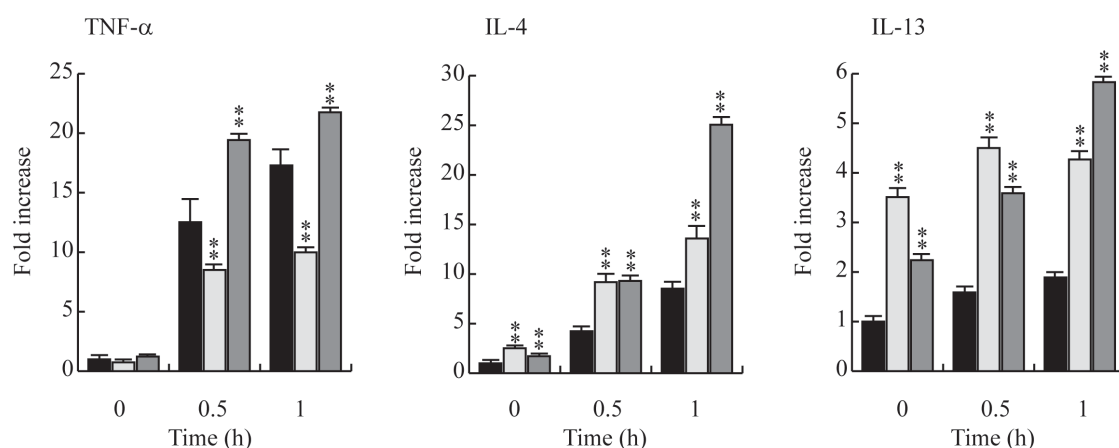
B



*: Statistically significant reduction ($p < 0.05$)

図 8 RBL-2H3 のサイトカイン mRNA レベルの PTP-PEST CS、PTP-PEST SA による制御

Mock 処理した細胞（黒色）と PTP-PEST CS（薄い灰色）あるいは SA（濃い灰色）を過剰発現させた細胞を、50 ng/ml SPE-7 を含む培地で培養した後、RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA を用いて 0 時間、0.5 時間、1 時間刺激を行った。それぞれの細胞から全 RNA を抽出し、ラットの TNF- α 、IL-4、IL-13 及び β -actin（内在性コントロール）に特異的な TaqMan プローブを使い、リアルタイム RT-PCR で TNF- α 、IL-4、IL-13 の mRNA 量を定量した。 β -actin を指標とした相対定量法により、mock 処理した細胞の刺激なし（0 時間）のそれぞれの mRNA 量は 0 分を”1”として、各刺激時間におけるサイトカインの mRNA の相対量をグラフに示した。それぞれ 4 サンプルの計測を行い、平均値 \pm 標準偏差をグラフにした。



**: Statistically significant difference ($p < 0.01$)

図 9 PTP-PEST による FcεRI 架橋で誘導される MAP キナーゼの活性化への制御

Mock 処理した細胞と PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させた細胞を、50 ng/ml SPE-7 を含む培地で培養した後、RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA を用いて 0 分と 5 分間刺激を行った。それぞれの細胞の細胞抽出液を 3 種の MAP キナーゼ (ERK、JNK、p38) に対する抗体 (それぞれのパネルの上のパネル) とリン酸化を受けて活性化した MAP キナーゼに対する抗体 (それぞれのパネルの下のパネル) を使い、イムノブロッティング法で 3 種の MAP キナーゼの活性化を調べた。それぞれの MAP キナーゼのパネルの右側のグラフは、それぞれのバンドを定量し、リン酸化 MAP キナーゼ量を MAP キナーゼの量で割った値を、刺激 0 分の mock 処理した細胞の値を 1 としてグラフにした。

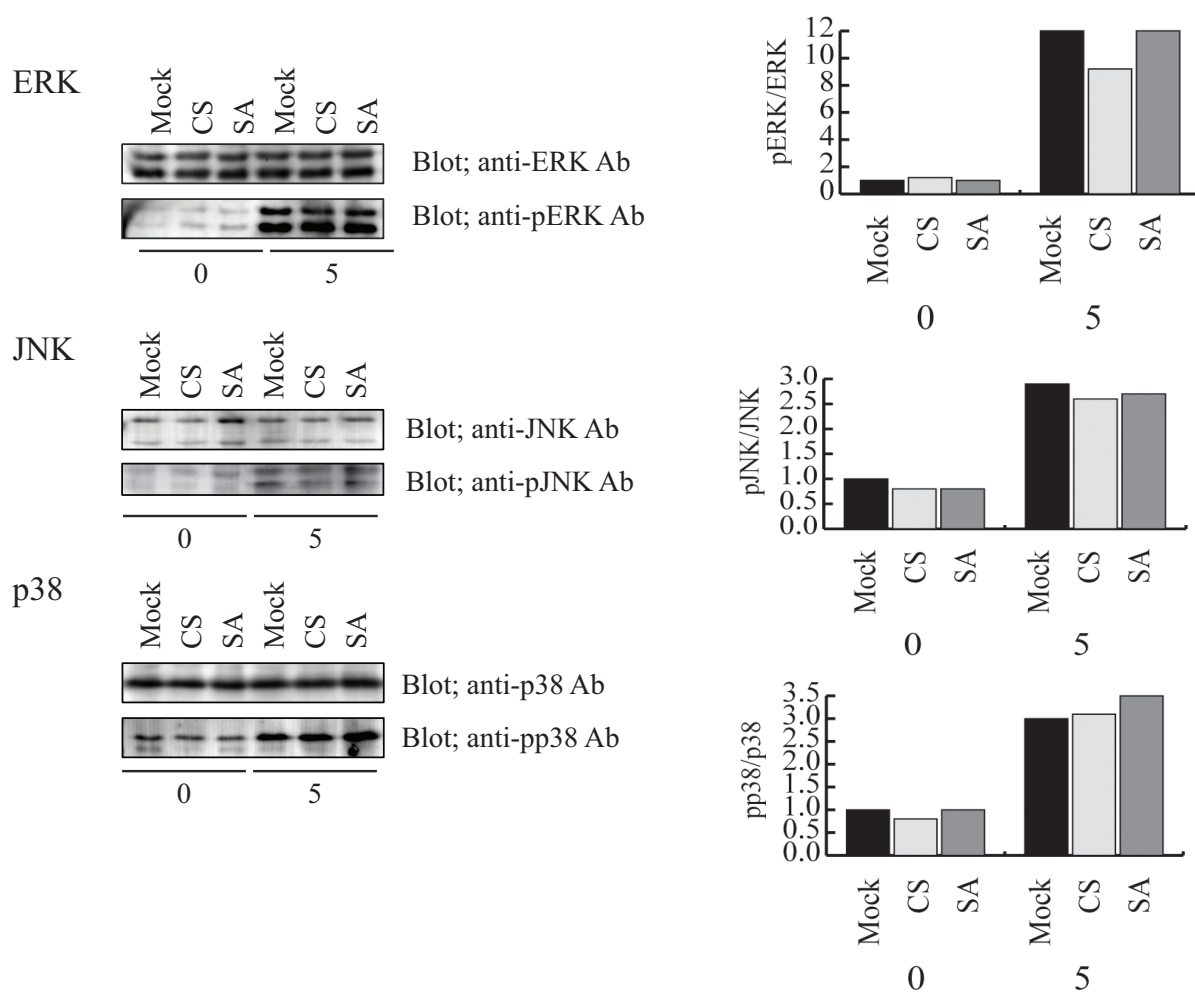


図 10 PTP-PEST による FcεRI 架橋で誘導される Akt の活性化への制御

Mock 処理した細胞と PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させた細胞を、50 ng/ml SPE-7 を含む培地で培養した後、RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA を用いて 0 分と 5 分間刺激を行った。(A) それぞれの細胞の細胞抽出液を抗 Akt 抗体(上のパネル)とリン酸化され活性化したリン酸化 Akt に対する抗体の抗 pAkt 抗体(下のパネル)を使ったイムノブロッティング法で、Akt の活性化を検出した。(B) それぞれのバンドを定量し、リン酸化 Akt 量を Akt 量で割った値を、5 分刺激をした mock 処理した細胞の値を 1 としてグラフにした。

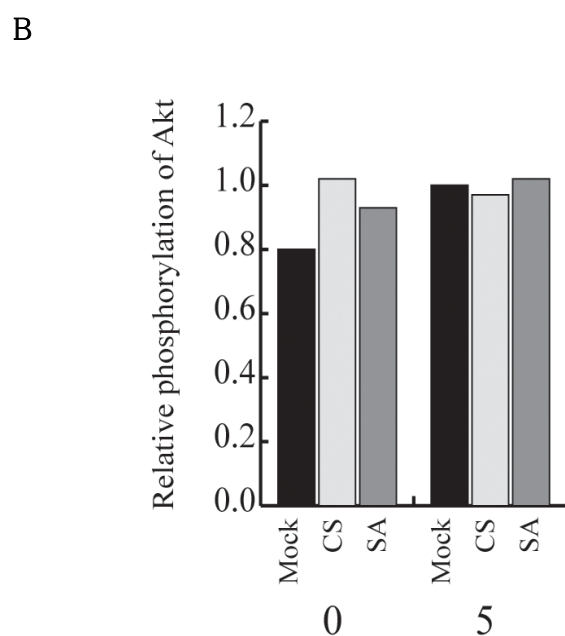
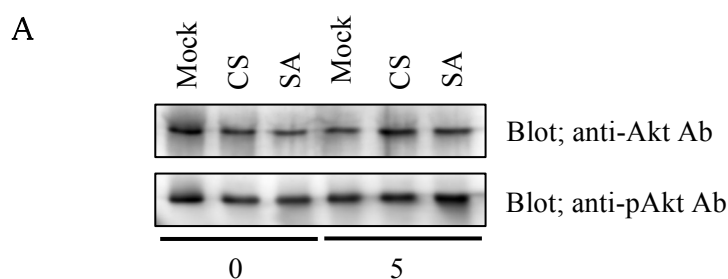
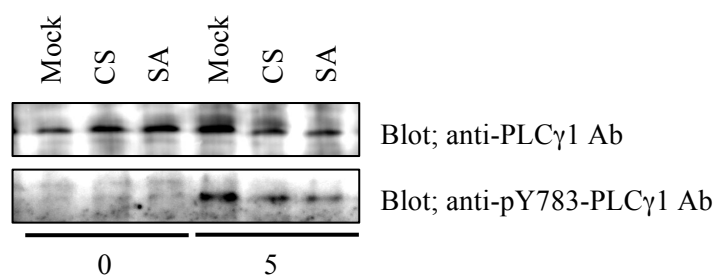


図 11 PTP-PEST による FcεRI 架橋で誘導される PLCγ1 の活性化への制御

Mock 処理した細胞と PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させた細胞を、50 ng/ml SPE-7 を含む培地で培養した後、RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA を用いて 0 分と 5 分間刺激を行った。(A) それぞれの細胞の細胞抽出液を抗 PLCγ1 抗体とリン酸化され活性化したリン酸化 PLCγ1 に対する抗体(上のパネル)の抗 pY738-PLCγ1 抗体(下のパネル)を使ったイムノブロッティング法で、PLCγ1 の活性化を検出した。(B) それぞれのバンドを定量し、リン酸化 Y783 量を PLCγ1 量で割った値を、5分刺激をした mock 処理した細胞の値を1としてグラフにした。

A



B

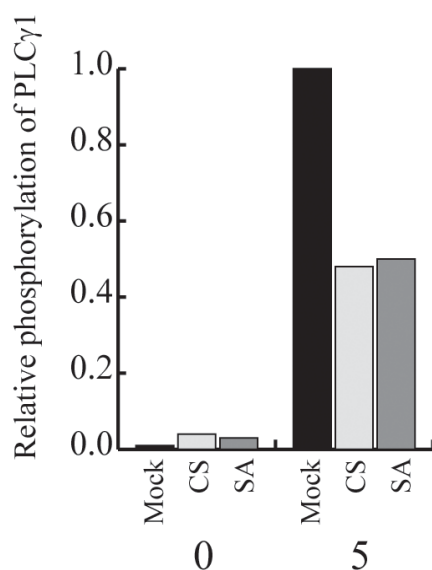


図 12 PTP-PEST による FcεRI 架橋で誘導される FAK と Pyk2 の活性化への制御

Mock 処理した細胞と PTP-PEST CS あるいは SA を過剰発現させた細胞を、50 ng/ml SPE-7 を含む培地で培養した後、RBL-2H3 細胞を 50 ng/ml の DNP-HSA を用いて 0 分と 5 分間刺激を行った。それぞれの細胞の細胞抽出液中の FAK と活性化 FAK (A)、Pyk2 と活性化 Pyk2 (C) を、抗 FAK 抗体と抗 pY397-FAK 抗体、抗 Pyk2 抗体と抗 pY402-Pyk2 抗体をそれぞれ使ってイムノブロッティング法で検出した。(B) (A) で得られたブロットを定量し、リン酸化 Y397 量を FAK 量で割った値を、5 分刺激をした mock 処理した細胞の値を 1 としてグラフにした。(D) (C) で得られたブロットを定量し、リン酸化 Y402 量を Pyk2 量で割った値を、5 分刺激をした mock 処理した細胞の値を 1 としてグラフにした。

